

# Vital imaging of large arteries using two-photon laser scanning microscopy : focus on the arterial wall

Citation for published version (APA):

Megens, R. T. A. (2008). *Vital imaging of large arteries using two-photon laser scanning microscopy : focus on the arterial wall*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20080314rm>

## Document status and date:

Published: 01/01/2008

## DOI:

[10.26481/dis.20080314rm](https://doi.org/10.26481/dis.20080314rm)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 05 May. 2023

# Summary

The circulation is a complex system consisting of different types of blood vessels. It is now recognized that these vessels are part of a subtle regulatory system with differential properties along the vascular tree. Alterations in the vessel wall may lead to various diseases such as atherosclerosis. Current knowledge of such vascular alterations is mostly based on histological studies of isolated samples that have lost viability. Functional properties of various compounds in the atherosclerotic vessel wall are still largely unknown. Better understanding of the functionality of the atherosclerotic arterial wall, and, thus, increased insight in (development of) atherosclerotic lesions requires studying of these properties *in vivo* or in viable arteries *ex vivo*. This thesis focuses on the vessel wall of large murine arteries and cultured cell systems using two-photon laser scanning microscopy (TPLSM) as an imaging tool for studying alterations in vessel wall properties during atherogenesis and their functional consequences.

In **chapter 2**, a brief literature survey is given of the biology of large arteries, the process of atherosclerosis, and animal models that can be used to study atherosclerosis. Then, the basic principles of conventional (single-photon) microscopy and TPLSM are discussed and compared. In addition, a short overview is dedicated to the fluorescent labeling of vascular structures and the current status of the applications of TPLSM for visualization of various aspects of larger arteries is discussed.

In **chapter 3** we evaluated applicability of TPLSM in large elastic and small muscular arteries under physiological conditions. To this purpose we developed a perfusion chamber model in which the arteries were mounted. Their viability was assessed and structural components such as elastin, collagen, nuclei, and endothelial glycocalyx were visualized. Moreover, functionality of the arteries was determined using diameter changes in response to noradrenaline and acetylcholine. We conclude that TPLSM enables visualization and quantification of subcellular structures in vital and functional elastic and muscular murine arteries, allowing unraveling of structure-function relationships in healthy and diseased arteries.

Atherogenesis involves structural and cellular changes in the vessel wall of large arteries. In advanced atherosclerosis, collagen content is considered to be a major determinant for plaque stability. In **chapter 4**, the novel fluorescent

collagen marker CNA35/OG488 was used to assess the distribution of collagen in mounted viable large arteries of control (C57BL6/J) and atherosclerotic (ApoE<sup>-/-</sup>) mice. The labeling characteristics of CNA35/OG488 were evaluated and compared with histology. Furthermore, the mounting method was adapted to visualize atherosclerotic lesions in the carotid artery bifurcation. The luminal uptake of CNA35/OG488 in mounted healthy arteries appeared to be limited by an intact endothelial layer and elastic laminae. However, in mounted atherosclerotic arteries, CNA35/OG488 did penetrate into the vessel wall and labeled the collagen structure in atherosclerotic lesions, indicative of alterations in endothelium and elastic laminae. Intravenous administration of CNA35/OG488 in living mice revealed that CNA35/OG488 might have potential as a molecular imaging marker for atherogenesis.

In **chapter 5** we visualized early and advanced atherosclerotic lesions in the carotid artery bifurcation as well as the direct relationship between collagen and inflammatory cells in intact viable mounted carotid arteries of control and atherosclerotic mice, at subcellular level. Isolated carotid arteries of ApoE<sup>-/-</sup> mice, aged 15 or 21 weeks, after 7 and 13 weeks on a western diet, and of C57BL6/J control mice fed a chow diet were mounted in a perfusion chamber, pressurized, and labeled with specific fluorescent markers for cell nuclei, inflammatory cells, collagen, and lipids. Special attention was paid to the fibrous cap regions and the various vessel wall layers. Control vessels had intact endothelium without adhering blood cells or significant intimal collagen labeling. In contrast, in ApoE<sup>-/-</sup> mice already at 15 weeks inflammatory cells adhered to the endothelium, while at the same time increased labeling of collagen was observed in the tunica intima both at lesion-prone and non-lesion-prone sites, both indicating endothelial activation. In plaques, located exclusively in carotid bifurcations of ApoE<sup>-/-</sup> mice, internalized inflammatory cell density increased with age and plaque progression. Interestingly, this was observed both in the tunica adventitia and in the tunica intima, while in the tunica media no inflammatory cells were detected at both ages. In the whole plaque, aging or plaque progression did not alter the direct relation between inflammatory cells and collagen. However, within the fibrous caps specifically, direct contact between inflammatory cells and collagen increased with age. Altogether, this study indicated that visualization of viable and structurally intact arteries provides new and detailed insight in the complex relationship between inflammatory cells and collagen in fibrous caps and whole plaques during atherogenesis and suggests involvement of the tunica adventitia in atherogenesis.

To further illustrate the applicability of TPLSM to functional studies on blood vessels, we studied nitric oxide (NO) production. Up till now most knowledge concerning the role of NO in arteries is based on indirect measurements. The importance of NO was never directly established in viable arteries by visualizing NO production in the vessel wall. To this end, a fluorescent probe is needed which relates changes in the presence of NO with changes in fluorescent signal. Furthermore, since NO exist for only very short periods of time such probe must be highly sensitive. In **chapter 6** we characterized and applied a Fluorescent Nitric-oxide Cheletropic Trap (FNOCT) for sensitive NO detection using TPLSM. Under physiological conditions the membrane-permeable ester FNOCT-5 neither significantly inhibits enzymatic NO production, nor acts as superoxide scavenger. We applied FNOCT-5 to sprouting and non-sprouting HUVECs cultured on beads in fibrin matrix. Intracellular enzymes transform FNOCT-5 into its accumulating dicarboxylate FNOCT-4. On binding NO, FNOCT-4 fluorescence undergoes a red to blue shift. We used the ratio of blue to red fluorescence as measure of NO production. Sprouting and non-sprouting cells that were not additionally stimulated did not produce detectable amounts of NO. However, in the same cell culture, sprouting cells showed significantly higher NO production than their non-sprouting counterparts when stimulated by calcium ionophore. Stimulation with acetylcholine resulted in even larger differences. These data show that visualization of cheletropic traps allows detection of local variations in NO production with subcellular resolution in physiologically relevant three dimensional systems and holds potential for application in viable arteries.

*In vivo* imaging of especially large arteries using TPLSM results in images (optical sections) that severely suffer from motional artifacts within each image and between subsequent images. In **chapter 7** we applied TPLSM image acquisition *in vivo*, triggered on cardiac and respiratory cycle; in addition image acquisition was accelerated in order to reduce the impact of motion between subsequent images and within each image. Carotid arteries of anesthetized C57BL6/J mice and renal arteries of anesthetized WKY-rats were surgically exposed, labeled with specific fluorescent markers for cell nuclei and cytoplasm, and imaged using TPLSM. Blood pressure and respiratory signals were recorded as triggering signals for (accelerated) image acquisition. Filtering in the Fourier domain was explored to improve overall image quality. In both mice and rats, timing of the trigger moment at the diastolic phase in the cardiac cycle combined with acquisition rates of 4 Hz or higher, resulted in stable images with reduced motional artifacts. Moreover, subsequently acquired images contained a similar and stable image of the artery.

Application of the Fourier transformation further improved overall image quality.

We have shown the feasibility of stable imaging of large arteries *in vivo* using TPLSM triggered on cardiac and respiratory cycle. The presented method creates new opportunities for *in vivo* studying of various structural and functional properties of the (diseased or damaged) arterial wall at subcellular level.

As described in the general discussion (**chapter 8**), the studies presented in this thesis demonstrate that TPLSM enables subcellular imaging of viable and intact large arteries of mice and rats in an *ex vivo* or *in vivo* environment. Application of our model of mounted arteries combined with appropriate fluorescent probes enables visualization of various structural properties of both healthy and atherosclerotic arteries. Detailed insight was provided into differences in vessel wall structure of elastic and muscular arteries. Furthermore, we assessed that the activation of the vascular endothelium in atherosclerosis-prone mice is not limited to the atherosclerosis prone sites and we demonstrated the association between collagen and inflammation within atherosclerotic lesions. The feasibility of functional imaging was explored and two novel fluorescent probes, for collagen and for nitric oxide, were evaluated. Finally, we have shown the feasibility of stable *in vivo* imaging of large arteries by triggering at a fixed moment in the cardiac and respiratory cycle.

We conclude that the described techniques offer a new and different view on healthy and diseased arteries which provides new insight in various structural and functional properties of atherogenesis. Further development of these techniques holds potential for future applications in both a scientific and clinical environment.

# Samenvatting

De circulatie van bloed in het menselijk lichaam gaat door een complex systeem dat bestaat uit arteriële (aanvoerende) en veneuze (afvoerende) bloedvaten, met daartussenin de microcirculatie met de capillairen (haarvaten). De vaatwandstructuur en ook de functies van de diverse typen bloedvaten zijn verschillend. Veranderingen in eigenschappen van de arteriële vaatwand kunnen leiden tot ziekten zoals atherosclerose (aderverkalking). Atherosclerose is een systemische ziekte van de grote arteriën en kan ernstige klinische complicaties tot gevolg hebben zoals hartfalen en herseninfarcten. Atherosclerose is de onderliggende oorzaak voor 50 % van alle sterftegevallen in de westerse wereld.

De huidige kennis over de veranderingen in de arteriële vaatwand tijdens atherosclerose is voornamelijk gebaseerd op histologische studies die zijn uitgevoerd in geïsoleerd, niet vitaal weefsel. Ondanks de grote bijdrage van histologische studies aan onze huidige kennis over bloedvaten, zijn de mogelijkheden tot het bestuderen van de functionele eigenschappen van structuren in de vaatwand zeer beperkt. Een verbeterd inzicht in de combinatie van structurele en functionele eigenschappen van de vaatwand kan mogelijk leiden tot meer kennis over (de ontwikkeling van) atherosclerotische laesies. Hiertoe dient gebruik gemaakt te worden van intacte en vitale bloedvaten, waarvan de vaatwand bestudeerd moet worden met nieuwe optische technieken met voldoende penetratiediepte. Een voorbeeld van zo'n techniek is fluorescentie microscopie gebaseerd op twee-foton excitatie.

Dit proefschrift is gericht op het toepassen van twee-foton laser scanning microscopie (TPLSM) voor het visualiseren van zowel structurele als functionele veranderingen in de vaatwand ten gevolge van atherosclerose.

**Hoofdstuk 2** betreft een literatuur overzicht waarin de biologie van de grotere arteriën en de ontwikkeling van atherosclerose wordt beschreven. Er wordt ingegaan op de verschillende diermodellen om atherosclerose te bestuderen, en daarnaast worden de basisbeginselen van conventionele en twee-foton fluorescentie microscopie beschreven. Ook worden diverse fluorescente markers die geschikt zijn voor het aankleuren van vaatwandstructuren in intacte en vitale bloedvaten gepresenteerd. Tenslotte is een overzicht gegeven van recent gepubliceerde toepassingen van twee-foton microscopie voor visualisatie van bloedvaten.

In **hoofdstuk 3** wordt de toepasbaarheid van twee-foton microscopie voor het visualiseren van vitale intacte elastische en musculaire arteriën van muizen

beschreven. Om dit mogelijk te maken is een perfusiekamer ontwikkeld waarin de vitaliteit en structuur van deze bloedvaten wordt bestudeerd. Componenten van de vaatwand van de in de perfusiekamer opgespannen arteriën, zoals elastine, diverse soorten cellen en de endotheliale glycocalyx, zijn gevisualiseerd. Bovendien is de functionaliteit van de opgespannen arteriën geëvalueerd door bepaling van diameter veranderingen ten gevolge van noradrenaline en acetylcholine stimulatie. Uit de resultaten blijkt dat TPLSM in combinatie met het perfusiekamer model het mogelijk maakt om structurele en functionele verschillen tussen diverse typen bloedvaten te bestuderen en zodoende een bijdrage kan leveren aan de kennis over de vaatwand en diverse (vasculaire) ziekten.

De veranderingen in de vaatwand ten gevolge van atherosclerose hebben betrekking op zowel cellulaire als structurele vaatwandcomponenten. In vergevorderde stadia van atherosclerotische laesies wordt de aanwezigheid van collageen en zijn structuur gezien als een belangrijke determinant voor de stabiliteit van deze laesies. In **hoofdstuk 4** is de distributie van collageen in opgespannen intacte en vitale arteriën van muizen bestudeerd door gebruik te maken van een nieuw specifiek label voor collageen, genaamd CNA35/OG488. Voor deze studie is tevens het perfusiekamer model, zoals beschreven in hoofdstuk 3, aangepast zodat ook de bifurcatie (splitsing) van de arteria carotis (halsslagader) kan worden opgespannen en gevisualiseerd. De labelingskarakteristieken van CNA35/OG488 in vitale gezonde en atherosclerotische arteriën zijn geëvalueerd en vergeleken met histologische gegevens.

De resultaten laten zien dat de opname van CNA35/OG488 in de gezonde vaatwand zeer beperkt is. Echter, in atherosclerotische carotiden blijkt CNA35/OG488 wel in de vaatwand door te dringen en collageen structuren in atherosclerotische laesies te labelen. Intraveneuze toediening van CNA35/OG488 in levende muizen laat verder zien dat CNA35/OG488 mogelijk potentie heeft als een moleculaire marker voor detectie van atherosclerotische laesies *in vivo*.

In de studie beschreven in **hoofdstuk 5** zijn de atherosclerotische laesies in de bifurcatie van de carotiden van atherosclerotische muizen (met een leeftijd van 15 en 21 weken) gevisualiseerd tot op subcellulair niveau ( $<1\ \mu\text{m}$ ). De ontwikkeling van atherosclerotische laesies is gevisualiseerd vanaf het initiële stadium tot aan de vergevorderde stadia. Daarnaast hebben we de relatie tussen collageen structuren en ontstekingscellen (inflammatoire cellen) in drie stadia van atherosclerose bestudeerd en gekwantificeerd.

In gezonde (controle) arteriën zijn geen aan het endotheel hechtende bloedcellen waargenomen. Ook is er geen significante collageen kleuring zichtbaar in de vaatwand. Dit is in tegenstelling tot arteriën van atherosclerotische muizen. Al in atherosclerotische muizen van 15 weken oud zijn er aan de endotheellaag hechtende bloedcellen zichtbaar. Ook is de hoeveelheid collageen kleuring in de intimale en mediale vaatwandlagen verhoogd, zowel op plaque-gevoelige locaties (bifurcatie) als op plaque-ongevoelige locaties in de arteriën. Dit is een aanwijzing voor het feit dat in deze muizen de arteriële endotheelcellen geactiveerd zijn.

In de atherosclerotische laesies, die alleen in de bifurcatie van de carotiden waargenomen zijn, neemt de hoeveelheid geïnternaliseerde/geïnfiltreerde inflammatoire cellen toe met leeftijd en plaque progressie. Deze toename is gevonden in de binnenste (tunica intima) en de buitenste (tunica adventitia) laag van vaatwand. In de middelste laag (tunica media) zijn geen inflammatoire cellen waargenomen. Wanneer een atherosclerotische laesie als één geheel wordt beschouwd zijn er geen effecten van leeftijd en plaque progressie gevonden op de relatie tussen collageen en inflammatoire cellen. In de fibreuze kappen van plaques, echter, blijkt het aantal inflammatoire cellen in direct contact met collageen wel toe te nemen met leeftijd.

Deze studie toont aan dat visualisatie van vitale en structureel intacte arteriën nieuwe en gedetailleerde inzichten kan verschaffen in de complexe relatie tussen inflammatoire cellen en collageen tijdens de ontwikkeling van atherosclerose (atherogenese). Bovendien laten de resultaten zien dat ook veranderingen optreden in de tunica adventitia tijdens de ontwikkeling en progressie van atherosclerotische plaques.

Ter illustratie van de bruikbaarheid van TPLSM om functionele eigenschappen van bloedvaten te bestuderen, is endotheliale stikstof oxide (NO) productie bestudeerd. De meeste kennis met betrekking tot de rol van NO in grote bloedvaten is gebaseerd op indirecte metingen en niet op directe waarnemingen in nog intacte en levende bloedvaten. Om dit mogelijk te maken is een functionele fluorescerende marker nodig die een verandering in de aanwezigheid van NO koppelt aan een verandering in fluorescent signaal. Bovendien moet een NO marker zeer gevoelig zijn omdat die slechts voor zeer korte periodes in het weefsel aanwezig is.

In **hoofdstuk 6** hebben wij als potentiële NO-marker het "fluorescent nitric oxide chelotropic trap" oftewel FNOCT gekarakteriseerd en toegepast voor NO-detectie met behulp van TPLSM. De membraan-permeabele ester FNOCT-5 blijkt onder fysiologische condities niet op superoxides te reageren en de NO-productie niet te beïnvloeden.



De bruikbaarheid van FNOCT-5 werd getest in een *in vitro* setup met gekweekte sproutende en niet-sproutende endotheelcellen. FNOCT-5 wordt door intracellulaire enzymen omgevormd tot de NO-sensitieve en sterk accumulerende sub-vorm dicarboxylate FNOCT-4, die onder invloed van NO-binding een kleurverschuiving van het emissielicht ondergaat (van rode naar blauwe golflengte). Met behulp van FNOCT-5 is het verschil in NO-productie tussen gestimuleerde (acetylcholine en calcium-ionofoor) sproutende en niet-sproutende endotheelcellen in beeld gebracht. Deze resultaten tonen aan dat FNOCT in combinatie met TPLSM het mogelijk maakt om lokale verschillen in NO-productie te visualiseren onder fysiologisch relevante omstandigheden en in 3 dimensies. Bovendien tonen de resultaten de potentie voor NO-detectie in vitale en structureel intacte bloedvaten aan.

Het afbeelden van met name de grotere bloedvaten in levende proefdieren (*in vivo* microscopie) leidt tot optische afbeeldingen die sterk lijden onder bewegingsartefacten. Deze bewegingsartefacten zijn waar te nemen in zowel de optische afbeeldingen zelf als tussen de achtereenvolgende optische afbeeldingen behorend bij een (tijd)serie van opnames. In **hoofdstuk 7** is TPLSM in combinatie met getriggerde beeldacquisitie toegepast om deze *in vivo* bewegingsartefacten te verminderen. Bij getriggerde beeldacquisitie wordt het startmoment van beeldacquisitie bepaald door een extern start signaal, in dit geval een combinatie van bloeddruk- en ademhalingsignalen die zijn afgeleid van het proefdier. Naast getriggerde beeldacquisitie is tevens de acquisitiesnelheid verhoogd. Deze methode is toegepast voor het bestuderen van vrijgeprepareerde carotiden van C57BL6/J muizen en WKY ratten. Fluorescente kleuringen zijn gebruikt voor het specifiek aankleuren van cytoplasma en celkernen. Na acquisitie is filtering van de opnames in het Fourier domein toegepast om de algehele beeldkwaliteit verder te verbeteren. In zowel muizen als ratten blijkt dat beeldacquisitie, getriggerd op de diastole hartfase van de hartcyclus en gecombineerd met een acquisitiesnelheid van 4Hz of meer, resulteert in stabiele opnames waarin bewegingsartefacten sterk gereduceerd zijn. Bovendien blijkt dat achtereenvolgende opnames binnen een tijdserie van opnames een vergelijkbaar deel van de halsslagader bevatten. Toepassing van Fourier transformatie leidde tot een verdere verbetering van de beeldkwaliteit.

Deze resultaten tonen aan dat het haalbaar is om grote arteriën *in vivo* te visualiseren op een subcellulair niveau door toepassing van TPLSM door middel van beeldacquisitie getriggerd op bloeddruk en ademhaling. Deze methode creëert nieuwe mogelijkheden voor het *in vivo* afbeelden van functionele en structurele eigenschappen van (zieke of beschadigde) grote bloedvaten.

Zoals beschreven in de Algehele Discussie in **hoofdstuk 8**, demonstreren de in dit proefschrift beschreven studies dat twee-foton laser scanning microscopie (TPLSM) een krachtige techniek is om intacte grote bloedvaten van muizen en ratten te visualiseren op een subcellulair niveau. Toepassing van het perfusiekamer model in combinatie met specifieke fluorescerende kleurstoffen maakt het mogelijk diverse structurele eigenschappen van zowel gezonde als atherosclerotische bloedvaten af te beelden. Een gedetailleerd inzicht is gegeven in verschillen in vaatwandstructuur tussen elastische en musculaire arteriën. Uit de studies in atherosclerotische arteriën is gebleken dat activatie van het vasculaire endotheel niet is beperkt tot plekken waar atherosclerotische laesies veel voorkomen (met name bifurcaties). Bovendien hebben we de locatie van collageen in relatie tot de aanwezigheid van ontstekingscellen bepaald in atherosclerotische laesies. De haalbaarheid van het afbeelden van functionele eigenschappen van de vaatwand is aangetoond en twee nieuwe fluorescente kleuringen, voor collageen en NO, zijn toegepast en geëvalueerd. Ten slotte is de haalbaarheid van het *in vivo* afbeelden van de vaatwand van grote arteriën aangetoond door middel van beeldacquisitie getriggerd op een vast moment in de hart- en ademhalingscyclus.

Hieruit kan worden geconcludeerd dat de beschreven technieken en methodes nieuwe mogelijkheden creëren om (gezonde en zieke) bloedvaten te bestuderen en nieuwe inzichten kunnen verschaffen in de structurele en functionele eigenschappen van ziektebeelden zoals atherosclerose. De verdere ontwikkeling van deze technieken kan mogelijk leiden tot nieuwe toepassingsgebieden voor zowel experimenteel als klinisch onderzoek.